Citometría de Flujo en el estudio de Eritrocitos

Bioquímica Katia Canalejo

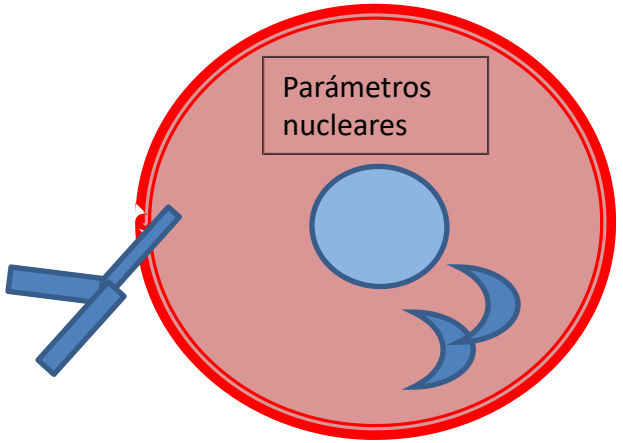
Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo

La utilidad de la citometría de flujo se fundamenta en que en relación con otras metodologías, aporta una *gran sensibilidad*, objetividad, *rapidez* y versatilidad analítica al estudio de la célula.

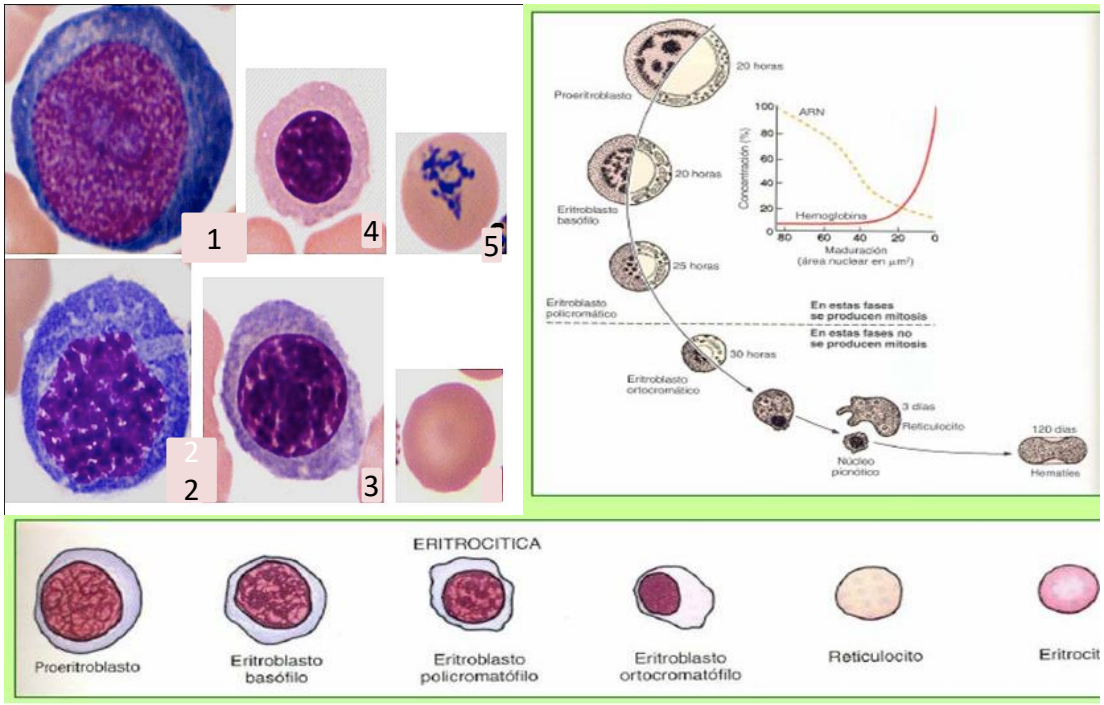
Serie eritroide

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula.

Parámetros medibles por CMF		
	ESTRUCTURALES	**FUNCIONALES**
Intrínsecos	Tamaño y forma celular Granularidad citoplasma Contenido pigmentos Fluoresc. proteínas	Estado de Red-Ox
Extrínsecos	Contenido DNA, RNA. Ratio bases ADN Estructura cromatínica Proteínas totales o básicas Grupos químicos Antigenos Azúcares superficie Estructura citoesqueleto	Estudios membrana Actividad enzimática Endocitosis Síntesis ADN Receptores Potencial de membrana pH, calcio, carga superficie



ERITROPOYESIS



Aplicaciones clínicas más utilizadas

- Recuento de Reticulocitos
- Recuento de Células nucleadas de la serie roja (NRBC)
- Identificación de proteínas de la membrana eritrocitaria
- Identificación de antígenos de superficie
- Detección de anticuerpos unidos a la membrana eritrocitaria

Recuento de Reticulocitos

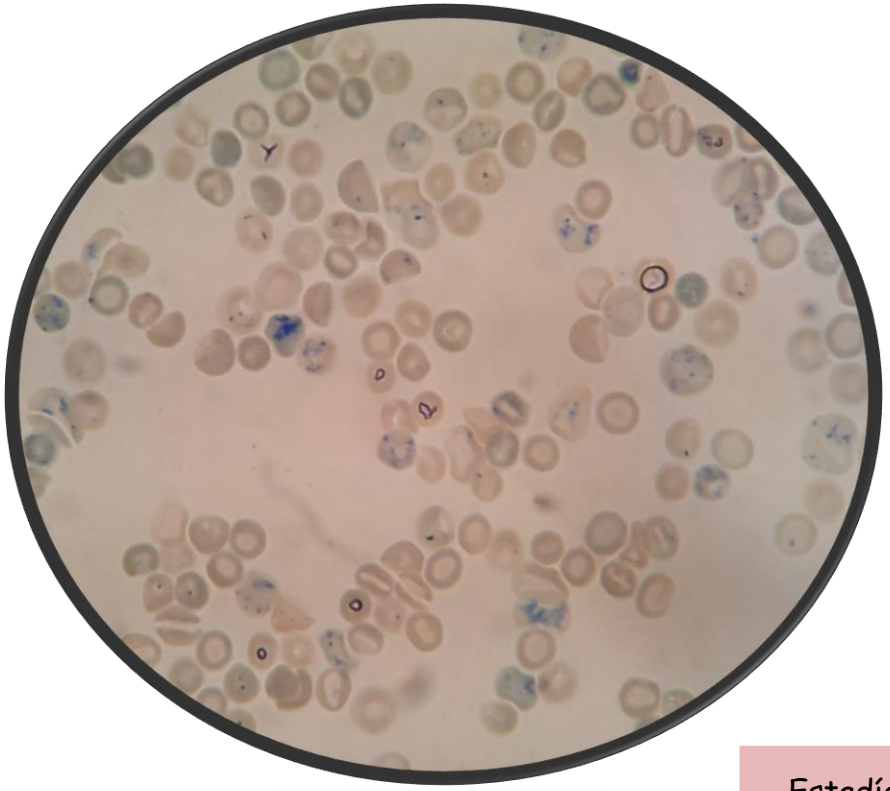
Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes que se diferencian de los eritrocitos maduros debido a que conservan en su citoplasma restos de ácido ribonucleico, ribosomas y mitocondrias que pueden ser identificados mediante diferentes colorantes .

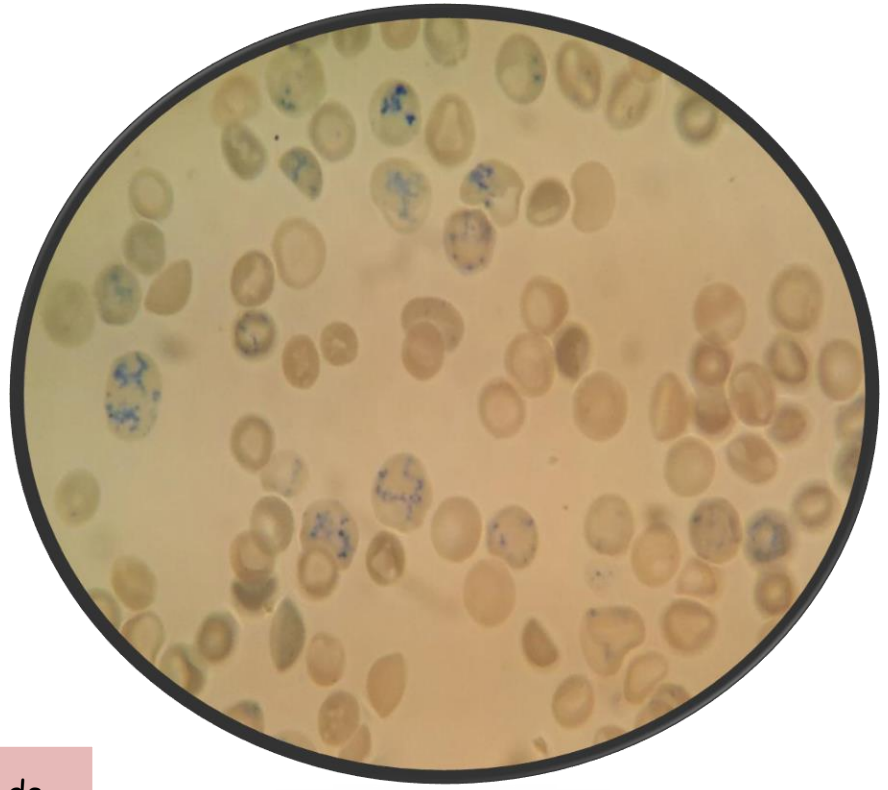
Los reticulocitos permanecen 2 a 3 días en la medula ósea y de 24 a 48 horas en la sangre periférica hasta cuando se completa su hemoglobinización y se tornan de aspecto maduro

La cantidad de reticulocitos en sangre indica la tasa de producción de eritrocitos en la medula ósea.

.

Reticulocitos





Estadíos de maduración

- I: retículo con coágulos densos
- II: retículo laxo
- III: retículo difuso
- IV: gránulos dispersos

CITOMETRO MULTIPARAMETRICO

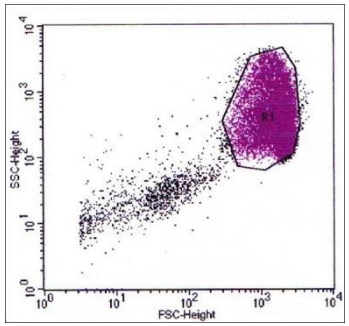
(prueba independendiente, Ej:citómetro de Flujo FACScan de Becton Dickinson)

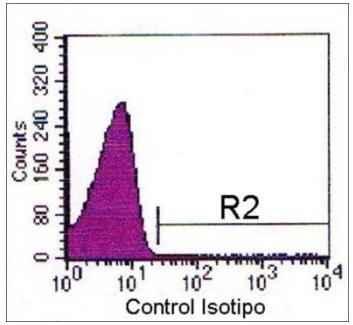
Marcación de reticulocitos: Incubar : Tubo 1: 2,5 µl sangre entera con 0,5 ml del reactivo Retic-COUNT (Naranja de Tiazol) de BD Biosciences .

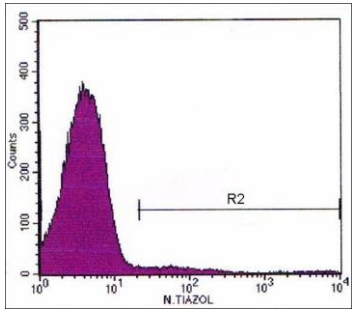
Tubo 2 : : 2,5 µl sangre entera con 0,5 ml con Buffer fosfato salino pH = 6.8 en lugar del reactivo (para descartar la fluorescencia inespecífica). Se incubó a temperatura ambiente 30 minutos, en la oscuridad

Adquisición y análisis

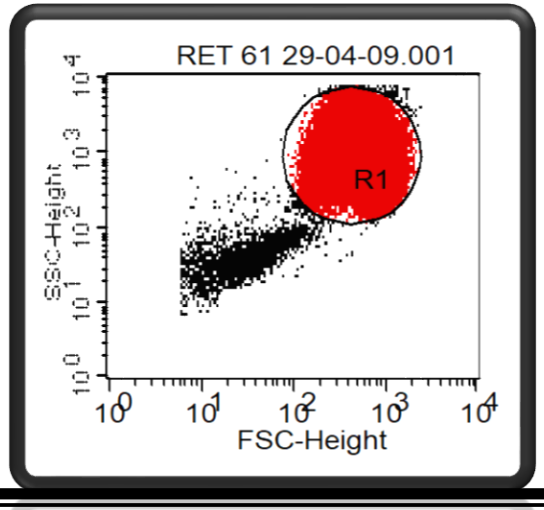
Se delimitó la zona de los glóbulos rojos (R1) sobre el gráfico FSC vs. SSC . Posteriormente sobre el histograma de R1, correspondiente al control negativo, se delimita R2 , zona de las células positivas que marca con Naranja de Tiazol. Se adquirieron 1000 eventos de la intersección de R1 y R2, para aumentar el rendimiento.

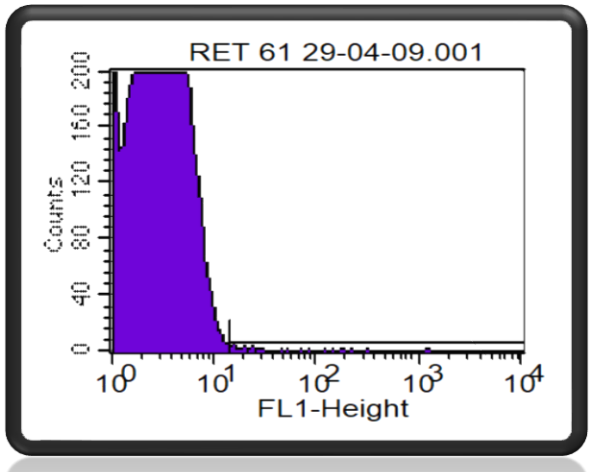






ANALISIS





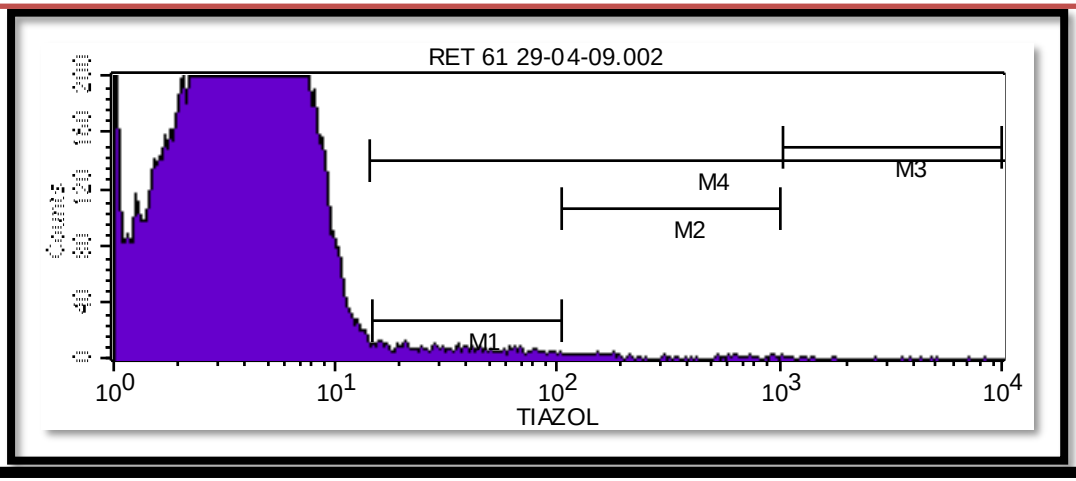
Histogram Statistics

File: RET 61 29-04-09.001
Sample ID:
Tube: tube #1
Acquisition Date: 29-Apr-09
Gated Events: 49862
X Parameter: FL1-Height (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: RETICULOCITOS
Gate: G1
Total Events: 52845

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Tota	Mean	Geo Mear	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991(	49862	100.00	94.36	3.20	2.67	230.18	2.71	1
M1	14, 991(	42	0.08	0.08	97.17	35.25	236.58	21.58	14

ANALISIS



Histogram Statistics

File: RET 61 29-04-09.002
Sample ID:
Tube: tube #2
Acquisition Date: 29-Apr-09
Gated Events: 55558
X Parameter: TIAZOL (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: RETICULOCITOS
Gate: G1
Total Events: 58995

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Tota	Mean	Geo Mear	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991(	55558	100.00	94.17	6.84	3.75	1144.99	3.82	1
M1	15, 10-	994	1.79	1.68	39.50	33.66	58.37	32.20	15
M2	104, 100(	162	0.29	0.27	307.47	232.17	82.36	170.01	145
M3	1027, 991(	22	0.04	0.04	2889.18	2169.17	86.26	1472.21	1036
M4	14, 991(	1200	2.16	2.03	127.39	46.35	407.01	36.85	15

Fracción de reticulocitos Inmaduros

Suma de las células que presenta intensidad de fluorescencia media y alta/ respecto al total de la muestra

Ej : 162+22/1200 = 0,15

	Reticulocitos (%)	Fracción de ret inmaduros (%)
Normales	1,85 ± 0,57	26,0 ±7
Anemia Hemolítica	7,9 ± 5,27	56,0±16

CONTADORES HEMATOLOGICOS ULTIMA GENERACION

- Métodos y colorantes que utilizan autoanalizadores hematológicos para el recuento reticulocitario
- Colorantes fluorescentes y dispersión óptica

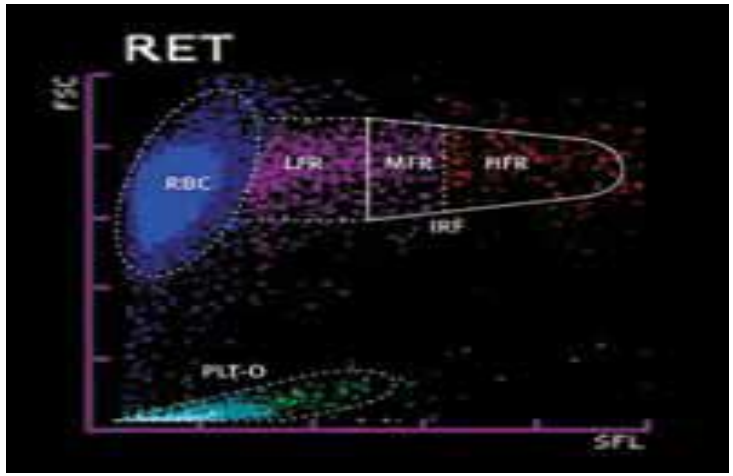
Coloración supravital y dispersión óptica

(tiñen y precipitan la sust reticular, producen esfericidad isovolumétrica)

	Coulter STKS	Sysmex SE 9000	Abbott Cell Dyn 3500	Bayer Advia 120
Método	Volumen Conductividad Dispersión óptica	Detección fluorescente	Dispersión óptica de ángulos múltiples (10° y 90°)	Dispersión óptica de ángulos bajo y alto (2-3° y 5-15°)
Colorante	Azul de Metileno Nuevo (coloración supravital)	Auramina O	Azul de Metileno Nuevo (coloración supravital)	Oxazina 750 (coloración supravital)

IRF
(Immature reticulocyte fraction)
(Contadores hematológicos)

Analizador	TECNOLOGIA	IRF (Media)	Intervalo de confianza
ADVIA 120	absorbancia	0,08	0,04-0,25
CELL DYN 4000	FLUORESCENCIA	0,24	0,15-0,35
Sysmex SE 9000	FLUORESCENCIA	0,13	0,05-0,21



PARAMETROS

	Valores de Referencia
Recuento de reticulocitos • porcentaje (%) • valor absoluto	 0,5 a 1,5 30000 - 70000
FRI fracción de reticulocitos inmaduros (IRF) (%)	0,20 - 0,45 20 - 45
CHr concentración media de Hemoglobina reticulocitaria (pg)	31 - 34
VCMr volumen medio reticulocitario (fl)	112,5 ± 17,5

INDICES RETICULOCITARIOS

Fracción de reticulocitos inmaduros

- Evaluación de la función eritropoyética (índice temprano y sensible)
- Diagnóstico diferencial de anemias no regenerativas y formas hiperregenerativas.
- Evaluación y clasificación de anemias en base a la FRI y el recuento de reticulocitos
- Monitoreo de la respuesta a terapias en caso de anemias por deficiencia de Fe, cobre, vitamina B12 y B6.
- Monitoreo de eritropoyesis después del trasplante de médula ósea o quimioterapia. (permite identificar la regeneración temprana)

Patologías y eventos clínicos

Casos clínicos	Reticulocitos	FRI
Crisis hemolíticas en anemias hemolíticas crónicas hereditarias	Aumentado	Aumentado
Hemorragias agudas o sub agudas	Normal o aumentado	Aumentado
Perdidas prolongadas de sangre	Normal o disminuido	Aumentado
Anemia por déficit de Vitamina B12 o Ácido fólico	Disminuido o normal	Variable Aumenta entre el día 2 a 4 de inicio terapia
Anemia por déficit de hierro	Disminuido o normal	Aumentado
Aplasia medular	Disminuido	Disminuido
Regeneración de la eritropoyesis	A partir del día 13 post trasplante	Aumenta a 0,5 (3 días antes que el umbral de granulocitos)

Patologías y eventos clínicos

La hemoglobina reticulocitaria, (CHr) permite

Evaluar la deficiencia funcional de hierro en estado de inflamación crónica y enfermedad renal crónica.

Evaluar precozmente la disminución de los niveles de hierro de depósito

Prueba tamiz en detección de ferropenia en la población general.

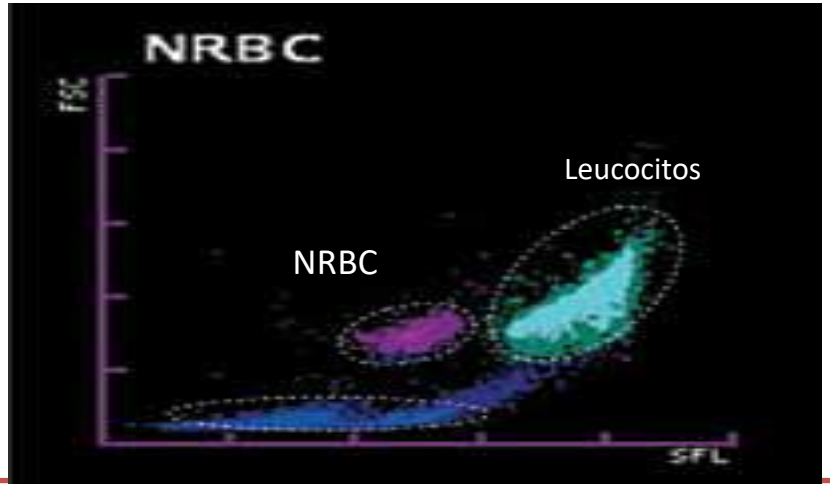
	Reticulocitos	FRI	CHr	VCMr
Anemia por falla renal	disminuidos	disminuidos	< a 26 pg (depleción de hierro	
Terapia con EPO	Aumento	Aumento	< a 23 pg (depleción de hierro	Aumento
Niños prematuros , síndromes mielodisplásicos , pacientes con cáncer anémicos, terapia alternativa a las transfusiones sanguíneas.				

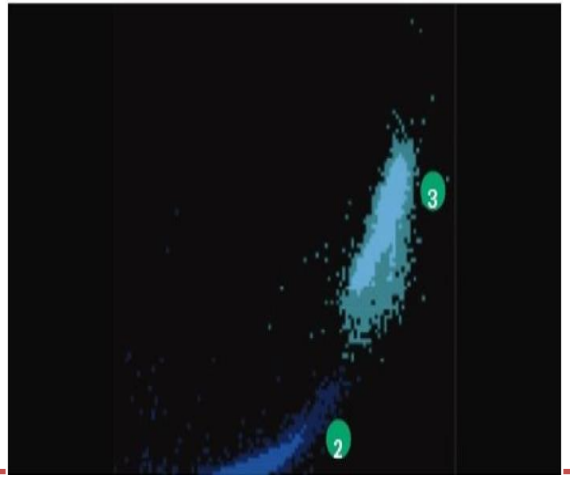
Recuento de Células nucleadas de la serie roja (NRBC)

NRBC	Sangre fetal y de neonatos
Eritroblastos policromatófilos y ortocromáticos	❖ Sangre periférica en casos de recuperación de anemias y deficiencias vitamínicas severas. ❖ Crisis hemolíticas
Proeritroblastos y eritroblastos basófilos	formación de sangre extramedular, trastornos de la médula ósea – barrera hematológica por metástasis tumorales, mielodisplasia,
Proeritroblastos y eritroblastos basófilos	enfermedades neoplásicas o eritroleucemia (tipo M6 según la clasificación de FAB).

Análisis automatizado de NRBC

- Los instrumentos Sysmex XE-2100 y XE-5000 detectan automáticamente las NRBC, las cuantifican y aplican la corrección requerida de WBC.
- Tecnología empleada – citometría de flujo por fluorescencia – recuento de alta precisión.
- Emplea un colorante fluorescente, que refleja el contenido real de ADN y ARN de la célula, diferenciación clara entre NRBC y leucocitos normales.



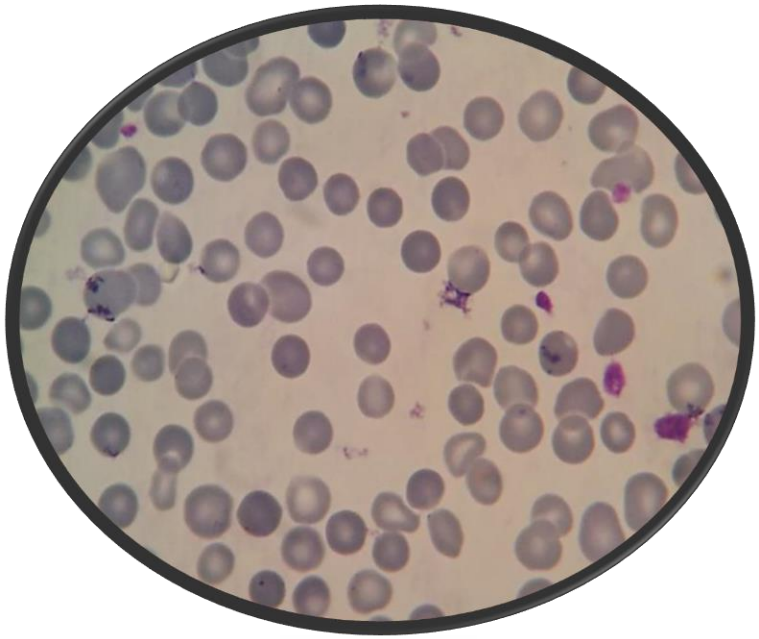


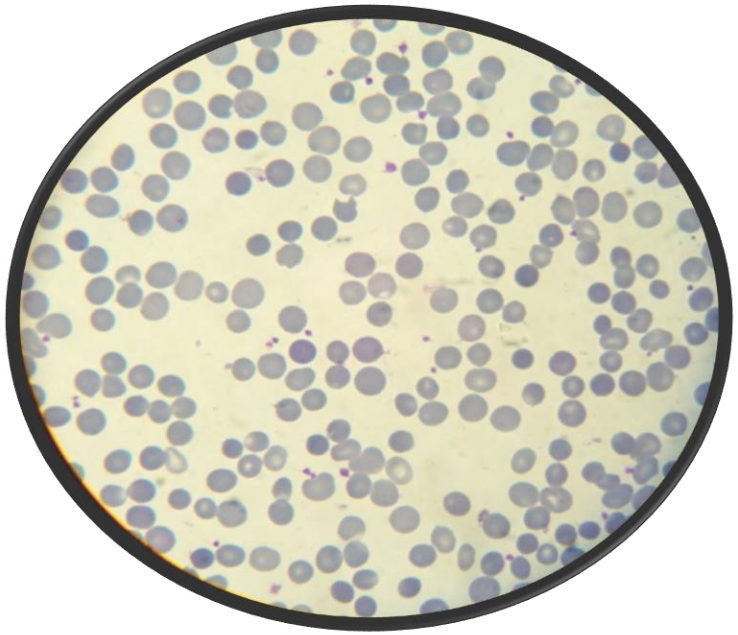
Fluorescencia

Ejemplo

Positive
Sample No. 11115884 Birth
Pat. ID
Name
Sex
Ward
Dr.
Date 11/01/2007
Time 09:46
Comment
Main Graph WBC/NRBC RBC/PLT Cumulative G-Flags Service HPC Body Fluid Research(WO) Resea
Measurement Parameters
Item Data Unit
WBC & 9.99 10^3/uL
RBC 3.81 10^6/uL
HGB 10.5 g/dL
HCT 32.2 %
MCV 84.5 - fL
MCH 27.6 pg
MCHC 32.6 g/dL
PLT 34 * 10^3/uL
RDW-SD 53.3 fL
RDW-CV 17.4 + %
MPV ---- fL
RET% 1.33 %
RET# 0.0507 10^6/uL
IRF 17.8 %
NRBC# 0.03 10^3/uL
NRBC% 0.3 /100WBC
RET-He 28.4 pg
IPF 16.7 %
Measurement Parameters
Item Data Unit
NEUT# 10.70 10^3/uL
LYMPH# 2.19 10^3/uL
MONO# 1.85 * 10^3/uL
EO# 0.35 * 10^3/uL
BASO# 0.03 * 10^3/uL
NEUT% 70.8 %
LYMPH% 14.5 %
MONO% 12.2 * %
EO% 2.3 * %
BASO% 0.2 * %
IG# 0.56 10^3/uL
IG% 3.7 %
HPC# 10^3/uL
DIFF
WBC/BASO
IMI
RET
RBC
PLT
Flag(WBC)
Blasts?
Imm Gran?
Left Shift?
Flag(RBC/RET)
Flag(PLT)
PLT Abn Dst
Thrombo-

ESFEROCITOSIS HEREDITARIA





Esferocitosis Hereditaria

- Anemia hemolítica congénita de alta prevalencia
- Caucásicos: 1/2000. Predominante en caucásicos noreuropeos (1/5000)
- Herencia autosómica dominante (65-75%) autosómica recesiva y mutaciones de novo
- Anemia hemolítica crónica de intensidad variable
- Esplenomegalia, ictericia, litiasis biliar
- **Defecto de proteínas de la membrana eritrocitaria**
- Defecto molecular heterogéneo en genes que codifican para:
- espectrina, ankirina, banda 3, palidina (Proteina 4.2)

PROTEINAS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

Atraviesan la bicapa lipídica

Se exponen al exterior plasmático

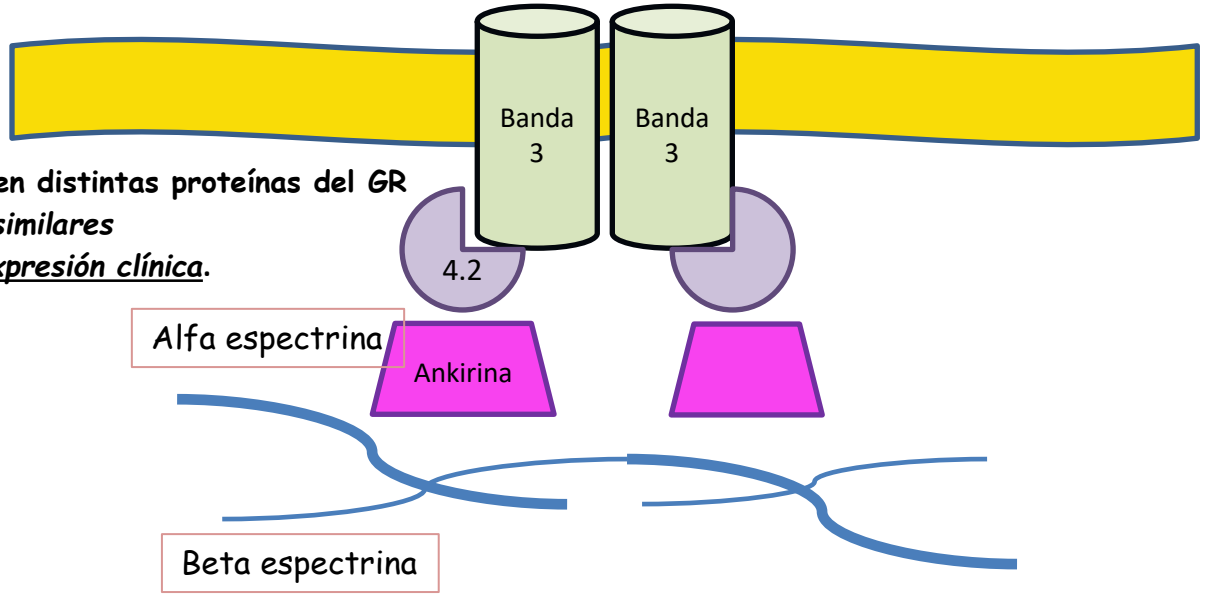
→ Glicoforinas
Banda 3

"Tapizan" el interior citoplasmático,por debajo de la bicapa lipídica

→ α y β espectrina
Proteína 2-1 (ankirina)
Proteína 4-1 (sinapsina)
Proteína 4-2 (palidina)
Proteína 4-9
Actina
Tropomodulina
Tropomiosina
Aducina

MEMBRANA ERITROCITARIA

conjunto heterogéneo de mutaciones en distintas proteínas del GR que generan *fenotipos morfológicos similares* aunque *pueden variar mucho en la expresión clínica*.

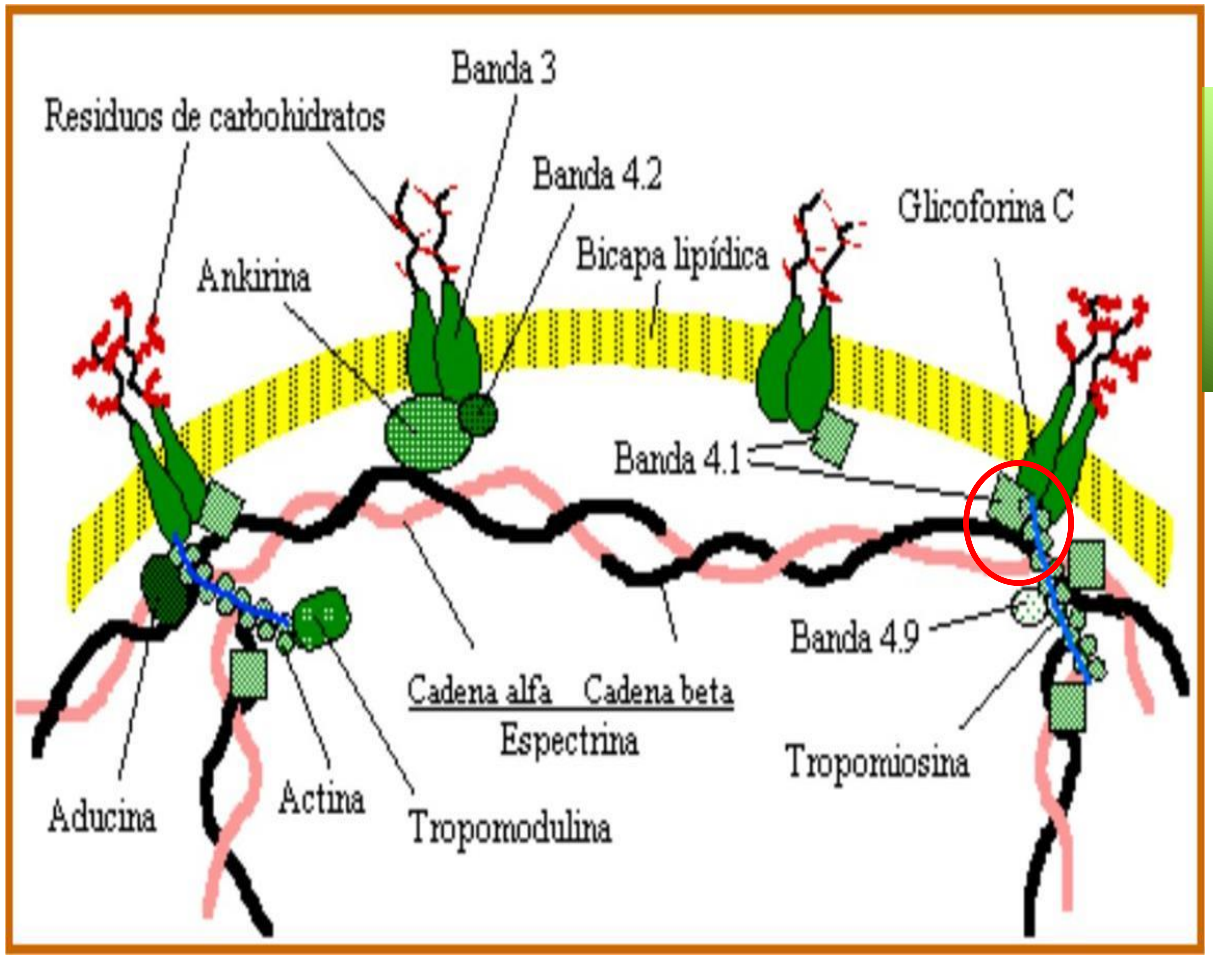


ANK > β-Esp > Bd3 > α-Esp y Bd 4.2

≈30-60% ≈15-30% ≈15-20% ≤5%

≈ 75% de los casos son Autosom Dom, excepto algunas variantes Recesivas de la Ankirina

BANDA 3



El dominio citoplasmatico N terminal interactúa con ankyrina, bandas 4-1 y 4-2, esas con la espectrina alfa-beta y estabilizan la bicapalipídica

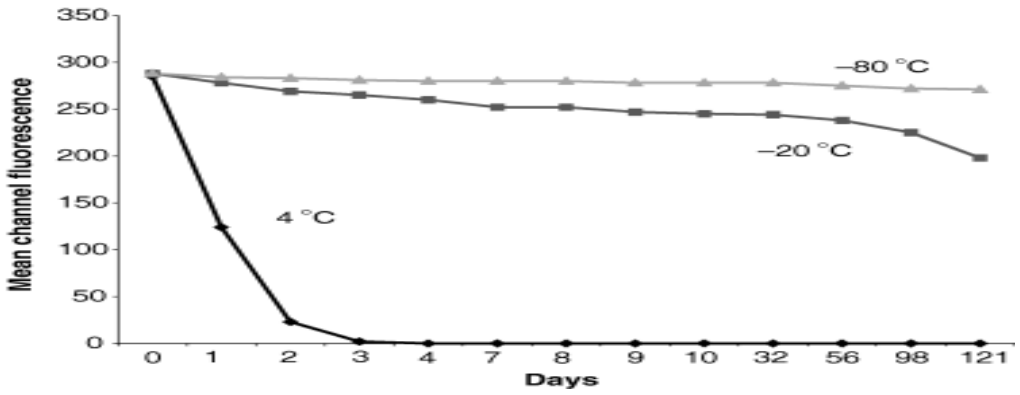
Intercambiador aniónico. Eflujo $HCO3^-$/influjo Cl^- (mecanismo ping-pong) En capilares de tejidos y revertido en capilares de los pulmones

TEST EMA

- Se utiliza un colorante fluorescente, eosina 5´ maleimida (EMA)
  - Se une covalentemente con la lisina 430 del primer dominio extracelular de la proteína banda 3
- En la Esferocitosis hereditaria cualquier ausencia o disminución de alguna de las proteínas de membrana , produce disrupción en el citoesqueleto y reduce la expresión normal de la proteína banda 3.
  - Si la banda 3 está disminuida , es menor la unión del EMA y la emisión de fluorescencia

PROCEDIMIENTO

- Muestra : Sangre anticoagulada con EDTA, realizar el test antes de las 24 horas de recolectada la muestra.
- Procesar 6 muestra controles normales. (Permite disminuir la variabilidad intraensayo)
- King MJ et al .Br J Haematol 2000; 111: 924-33.
- Colorante : cc final para realizar el test 0,5mg/ml (PBS)
- Alicuotar la sc Stok a -20°C, protegido de la luz
- Descongelar al momento de ser utilizada.

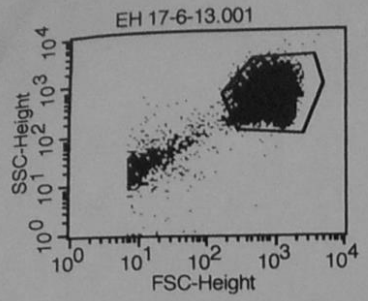


PROCEDIMIENTO

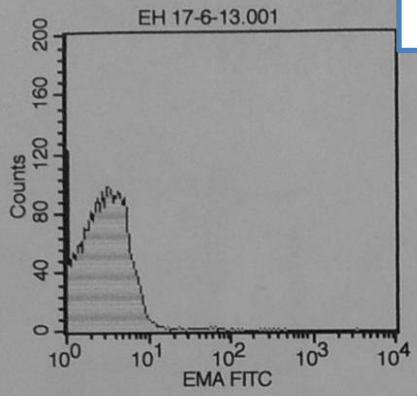
- Adquirir como mínimo 15000 eventos de la región de eritrocitos, en el canal Fl1, (fluorescencia verde)
- Obtener el valor de Intensidad de fluorescencia.

  (media, mediana)
- Gráfico FSS/SCC escala logarítmica para delimitar la región de eritrocitos.

17-6-13



Muestra: sangre c/EDTA → GR lavados c/SF



Control Autofluorescencia: GR lavados SIN colorante fluorescente

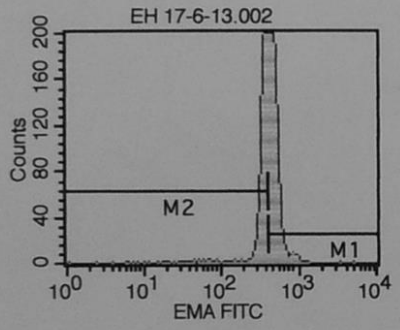
Histogram Statistics

File: EH 17-6-13.001
Sample ID:
Tube: tube #1
Acquisition Date: 17-Jun-13
Gated Events: 14975
X Parameter: EMA FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: INVESTIGACION
Gate: G1
Total Events: 16142

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14975	100.00	92.77	3.73	2.81	683.63	2.89	1

GR Normal: Fluorescencia ≈ 390

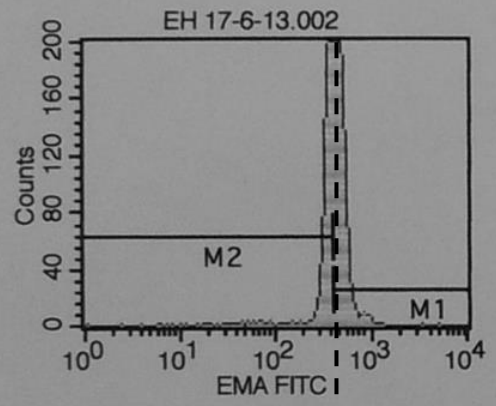


File: EH 17-6-13.002
Sample ID:
Tube: tube #1
Acquisition Date: 17-Jun-13
Gated Events: 15765
X Parameter: EMA FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: INVESTIGACION
Gate: G1
Total Events: 20023

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	15765	100.00	78.73	396.82	387.93	21.56	392.42	392
M2	1, 389	7831	49.67	39.11	344.99	338.64	12.75	355.45	385
M1	389, 9910	8327	52.82	41.59	445.19	440.86	19.02	429.35	392

GR Normal: Fluorescencia ≈ 390



Histogram Statistics

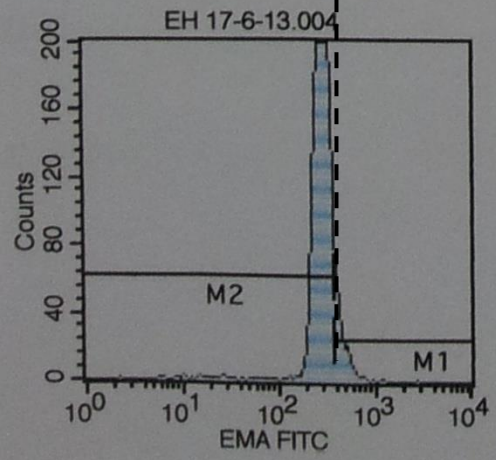
File: EH 17-6-13.002
Sample ID:
Tube: tube #1
Acquisition Date: 17-Jun-13
Gated Events: 15765
X Parameter: EMA FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: INVESTIGACION
Gate: G1
Total Events: 20023

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	15765	100.00	78.73	396.82	387.93	21.56	392.42	392
M2	1, 389	7831	49.67	39.11	344.99	338.64	12.75	355.45	385
M1	389, 9910	8327	52.82	41.59	445.19	440.86	19.02	429.35	392

GR Paciente: Fluorescencia ≈ 279 → 70% vs Normal

Mediana Paciente ≈ 70%
Mediana Normal



Histogram Statistics

File: EH 17-6-13.004
Sample ID:
Tube: tube #1
Acquisition Date: 17-Jun-13
Gated Events: 14273
X Parameter: EMA FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: INVESTIGACION
Gate: G1
Total Events: 18232

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	14273	100.00	78.29	286.02	278.79	22.54	278.81	273
M2	1, 389	13535	94.83	74.24	276.41	271.42	16.03	276.32	273
M1	389, 9910	782	5.48	4.29	458.20	451.76	23.14	437.14	399

Pacientes con Esferocitosis congénita: Fluorescencia ≈ 55 – 79 % vs Normales

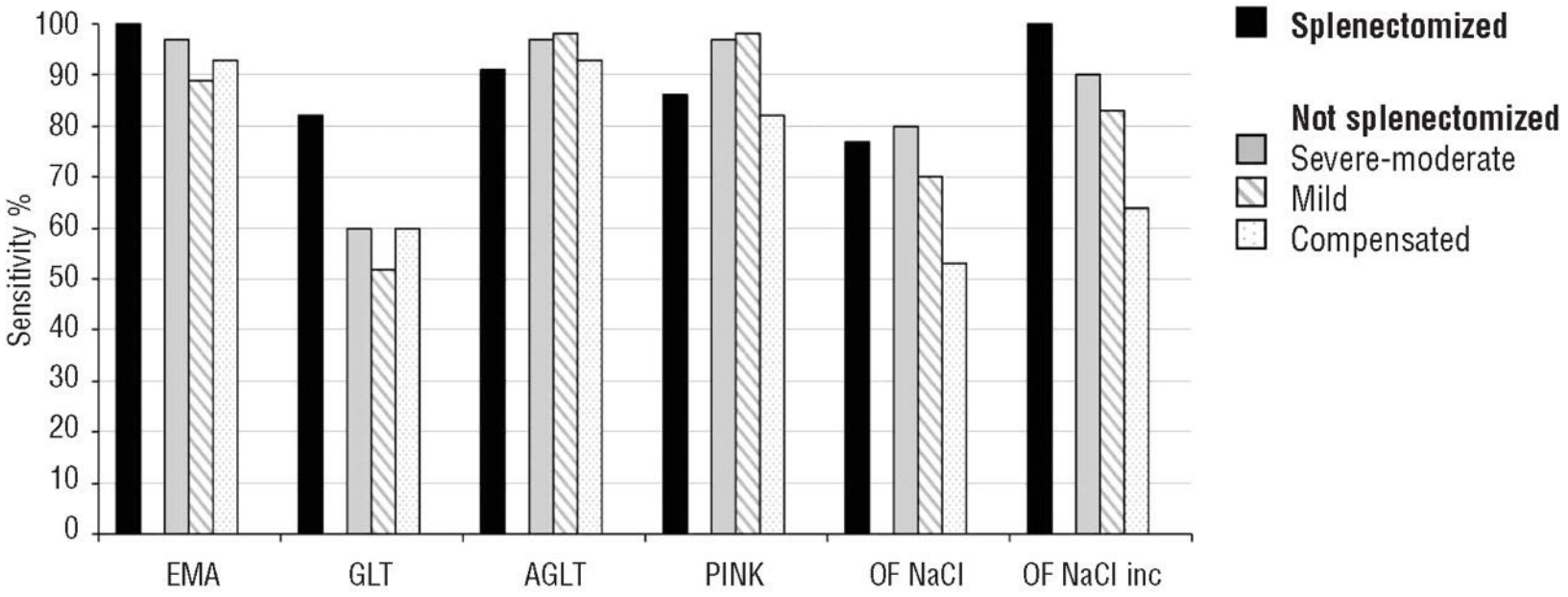
Valores de referencia

	NORMALES	E H	p
MIF	464,36 ± 66,33	315 ± 52,23	< 0,001
M 1	54,25 ± 7,10	3,9 ± 2,58	< 0,001
MIF/VCM	5,13 ± 0,98	3,81 ± 0,69	< 0,001
% MIF P/N		67,18 ± 6,27	

- ✓ **MIF** (mediana de intensidad de fluorescencia)
- ✓ **M1** (zona en que el normal tiene el 50 % de eritrocitos con mayor fluorescencia)
- ✓ **MIF/VCM** (relación mediana intensidad de fluorescencia con respecto al volumen corpuscular media)
- ✓ **% MIF P/N** (porcentaje de la mediana de intensidad de fluorescencia paciente con respecto al normal)

Disminución de IFM. Es > 17%, en pacientes con EH

Sensitivity of various diagnostic tests in 22 splenectomized and 128 not splenectomized patients with hereditary spherocytosis (HS).



Sensibilidad 92,7 %
Especificidad 99 %

Paola Bianchi et al. Haematologica 2012;97:516-523

©2012 by Ferrata Storti Foundation

Inmunohematologia

Detección y cuantificación de proteínas fijadas o unidas a los eritrocitos, por ej inmunoglobulinas y complemento.
Ej ⟶ Diagnostico de Anemias hemolíticas autoinmunes

Detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos eritrocitarios
Ej ⟶ Detección de pequeñas poblaciones eritrocitarias, por transfusiones sanguíneas, por trasplante de médula ósea.

Detección y cuantificación de eritrocitos fetales en sangre materna- Hemorragia feto materna.

Detección y cuantificación de eritrocitos adultos con aumento de Hb fetal, ej enfermedad de células falciformes (HB S), diagnóstico y control de tratamiento.

Hemorragia feto materna

Antígenos utilizados para identificar eritrocitos fetales :

Hemoglobina Fetal

Antigeno D (sistema Rh)

Test tradicional : Prueba de Kleihauer Betke (método de elución ácida)

Ventajas de la CF:

- Distingue con precisión GR de adultos de Gr fetales
- Rapidez en la obtención del resultado
- Mayor precisión (x el número de cels analizadas)
- Mayor reproductibilidad
- Coeficiente de variación < 15%,al detectar células fetales > a 0,1

Importancia clínica

Prevenir la aloinmunizacion en mujeres Rh Neg

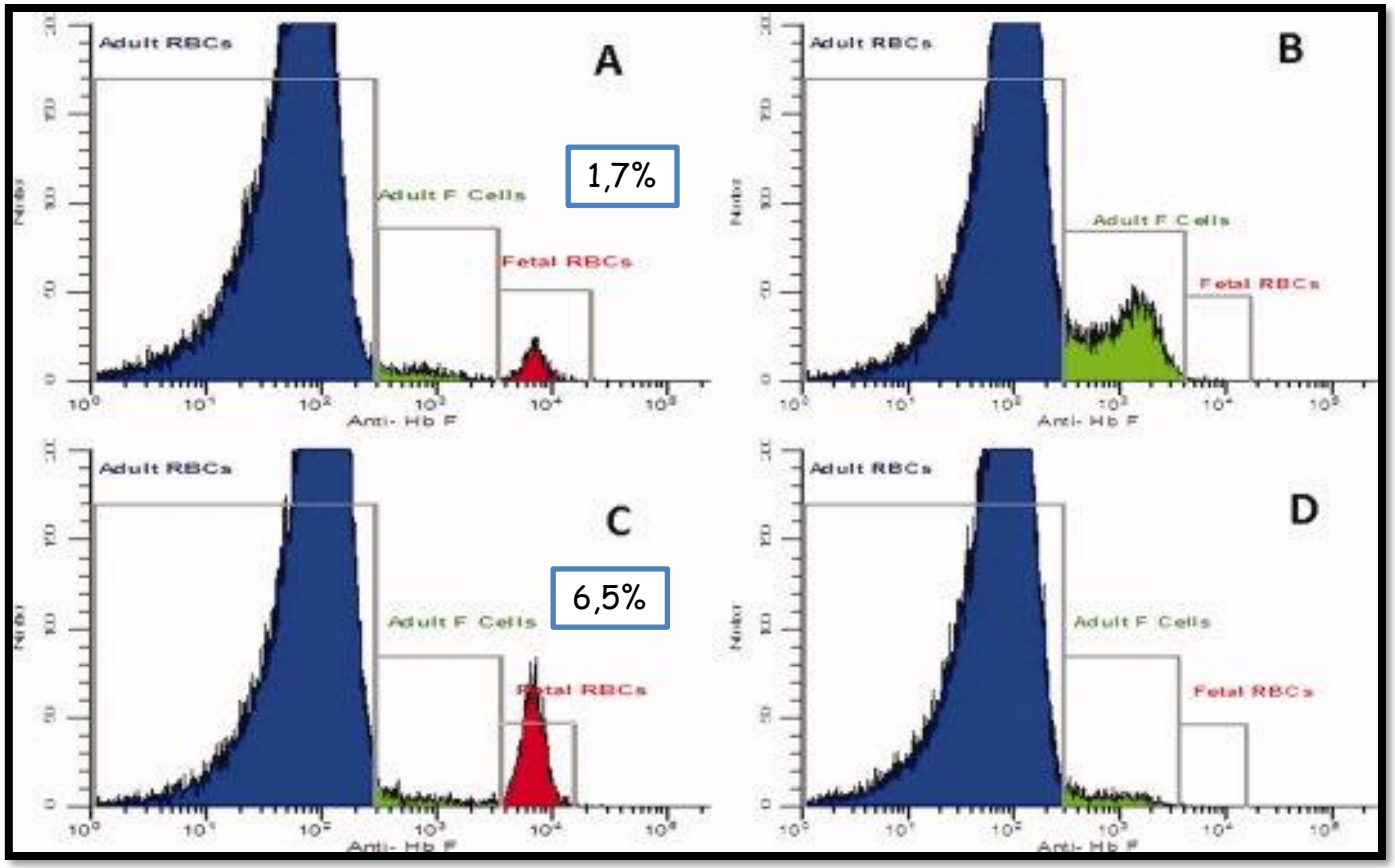
La dosificacion de IgRh se calcula en base al volumen de la HFM

Identificacion de Hb FEtal

- Muestra : sangre materna anticoagulada EDTA
- 2,5 × 107 células rojas se fijan 0,05 % de glutaraldehído y luego se permeabilizan con un detergente (Triton X- 100) que permite a los anticuerpos para penetrar las membranas celulares y se unen a la HbF intracelular.
- Ac anti Hb fetal marcado con FITC
- Adquisión de > de 50.000 eventos
- Control positivo (eritrocitos fetales)
- Sensibilidad requerida para prueba de screening 0,5% (1 eritrocito fetal en 200 eritrocitos maternos)

	Elución Acida	CF
Reproducibilidad (CV)	150 %	0,33%
Diferencia entre Eritrocitos adultos y fetales	NO	SI

Detección de hemorragia feto-materna



American Journal of Hematology
Volume 87, Issue 4, pages 417-423, 9 JAN 2012 DOI: 10.1002/ajh.22255
http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.22255/full#fig3

Diagnóstico de AHAI

- Test confirmatorio para pacientes con evidencias clinicas de AHAI y test de antiglobulina directa negativo.
- FC permite detectar pequeñas cantidades de Ac unidos a loe eritrocitos
  - Detecta IgM como Ac sensibilizante, IgM monómerica
    - Identificar subclases de IgG
    - Generalmente se utiliza anti IG- FITC

	Normales	Pac Test AGD +	Pac Test AGD -
IFM	< 3,6	18,3 ±7,78	7,88±1,35

BIBLIOGRAFIA

- https://www.sysmex.com/la/es/Products/Documents/XE-2100-
- http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2007/myl011-12b.pdf
- http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/20/66/ES-2206613_T3.pdf
- Fayek MH, Saad AA, Eissa DG, Tawfik LM, Kamal G. Role of gel test and flow cytometry in diagnosis of Coombs' negative autoimmune haemolytic anaemia. Int J Lab Hematol. 2012;34(3):311-319. doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01397.

GRACIAS